

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

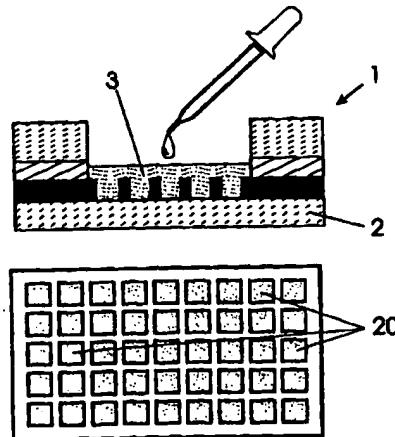
(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  B01J 19/00, C07B 61/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/36827  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. August 1998 (27.08.98)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00676</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Februar 1998 (07.02.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 06 570.8 19. Februar 1997 (19.02.97) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: ERMANTRAUT, Eugen [DE/DE]; Mühlenstrasse 4, D-07745 Jena (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÖHLER, Johann, Michael [DE/DE]; Untergasse 8, D-07751 Golmsdorf (DE). SCHULZ, Torsten [DE/DE]; Nollendorfer Strasse 11, D-07743 Jena (DE). WOHLFART, Klaus [DE/DE]; Nr. 3, D-07751 Laasan (DE). WÖLFL, Stefan [DE/DE]; Bahnhofstrasse 16, D-83059 Kolbermoor (DE).</p> <p>(74) Anwalt: PFEIFFER, Rolf-Gerd; Patentanwaltsbüro Pfeiffer &amp; Partner, Helmholtzweg 4, D-07743 Jena (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING STRUCTURED, SELF-ORGANIZED MOLECULAR MONOLAYERS OF INDIVIDUAL MOLECULAR SPECIES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON STRUKTURIERTEN, SELBSTORGANISIERTEN MOLEKULAREN MONOLAGEN EINZELNER MOLEKÜLARER SPEZIES, INSbesondere von SUBSTANZBIBLIOTHEKEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for producing structured, self-organized molecular monolayers of individual molecular species. The invention is preferably used to create solid-phase bonded substance libraries. To this end, a) a substrate (2) suitable for the first monolayer is provided; b) a microstructured polymer mask (1) having openings is applied to the substrate (2) at least once in a defined direction. Said polymer mask (1) is sufficiently thin and flexible for it to adhere to the substrate (2) by adhesion, and the material selected for the polymer mask (1) is chemically stable; c) the sandwich constituted by the substrate (2) and polymer mask (1) is flooded with a first agent corresponding to the intended use, so as to create at least one first molecular monolayer in the areas defined by the mask openings; c1) depending on the monolayer structure to be created step c) is repeated using the first agent or one or more additional agents; and d) after carrying out the step described in c) or the steps described in c) and c1), the polymer mask is pulled off after modification of the substrate surface areas which were left uncovered by the mask openings and were subjected to the agent or agents.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von strukturierten, selbstorganisierten molekularen Monolagen einzelner molekularer Spezies. Bevorzugt findet die Erfindung Anwendung zur Ausbildung von festphasengekoppelten Substanzbibliotheken. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß a) auf einer ersten Monolage angepaßtem Substrat (2); b) eine mikrostrukturierte Polymermaske (1), die Öffnungen aufweist, wenigstens einmal auf das Substrat (2) definiert ausgerichtet aufgelegt wird, wobei die Polymermaske (1) so dünn und flexibel ausgeführt ist, daß sie bereits durch Adhäsion auf dem Substrat (2) haftet und die Auswahl des für die Polymermaske (1) eingesetzten Materials chemisch stabil ist; c) das Sandwich, bestehend aus Substrat (2) und Polymermaske (1), mit einem dem Anwendungszweck entsprechenden ersten Agens, zur Bildung wenigstens einer ersten molekularen Monolage in den Maskenöffnungsbereichen, überschwemmt wird, c1) der Schritte nach c) je nach auszubildender Monolagenstruktur mit dem ersten Agens oder ein oder mehreren weiteren Agens wiederholt wird und d) nach Ausführung des Schritts nach c) oder der Schritte nach c) und c1) die Polymermaske nach erfolgter, den Maskenöffnungsbereichen entsprechenden Modifikation der, dem Agens oder den Agens ausgesetzten Substratoberflächenbereiche abgezogen wird.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Maurenien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Herstellung von strukturierten, selbstorganisierten molekularen Monolagen einzelner molekularer Spezies, insbesondere von Substanzbibliotheken

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von strukturierten, selbstorganisierten molekularen Monolagen einzelner molekularer Spezies. Bevorzugt findet die Erfindung Anwendung zur Ausbildung von 10 festphasengekoppelten Substanzbibliotheken oder von anderen Assays zur Testung molekularer Wechselwirkungen.

Derartige Bibliotheken, die dem schnellen Auffinden von 15 wechselwirkenden Partnern auf molekularer Ebene dienen, sind grundsätzlich bekannt. Solche Substanzbibliotheken werden nach dem bekannten, der Erfindung am nächsten kommenden Stand der Technik auf verschiedene Weise erzeugt. So ist der Einsatz sogenannter "microbeads", worunter kleine Perlen zu verstehen sind, die an ihrer Oberfläche einen molekularen Reaktionspartner tragen, bekannt. 20 Weiterhin ist zur Herstellung solcher Bibliotheken ein sogenanntes "mix&split"-Verfahren [Erb, E.; Jander, K.D.; Brenner, S.: Recursive Deconvolution of Combinatorial Chemical Libraries, Proc. of Natl. Acad. Sci. USA 91, S. 11422-6 (1994)] bekannt.

Besondere Vorteile bieten festphasengekoppelte Bibliotheken, deren 25 Komponenten eindeutig durch ihre Position (x-y-Richtung) bestimmt sind. Zur seriellen Erzeugung solcher Bibliotheken werden z.B. modifizierte Strahldrucker eingesetzt, die die miteinander in Verbindung zu bringenden Substanzen auf ein vorgegebenes Substrat punktförmig aufsprühen (Schober, A. Günther, R.; Schwienhorst, A. Döring, M.; 30 Lindemann, B.F.: Accurate high-speed liquid Handling of very small biological samples, Biotechniques 15: S. 324-9, 1993). Zur parallelen Erzeugung solcher Bibliotheken sollen sogenannte "applicator" Verwendung finden, bei denen ein Kopf, versehen mit vielen dünnen Kanälen, auf eine Oberfläche aufgesetzt wird und zugleich eine Vielzahl 35 von Mikroreaktionsräumen bedienen kann; vgl. z.B.US 5,429,807. Für genannte Zwecke ist weiterhin der Einsatz von lichtaktivierbaren

- 2 -

Schutzgruppen (US 5,489,678) und von Stempeltechniken (DE 195 43 232.0) bereits beschrieben.

Diesen bekannten Verfahren und Vorrichtungen haften ein oder mehrere prinzipielle Nachteile an:

5 So kann durch den Einsatz von Strahldruckern nicht gleichzeitig eine größere Anzahl von Oberflächenelementen auf einmal mit einer Substanz bedient werden, da es sich dabei um einen seriellen Prozeß handelt. Die als "applicator" bekannten Vorrichtungen stoßen bzgl. ihrer Miniaturisierung an technisch mögliche Grenzen. Stempelsynthesen, die sich oberflächenstrukturierter und -profilerter Stempel zur Übertragung einer Substanz bedienen, verursachen erhebliche Probleme bei der exakten Positionierung; reproduzierbare Mehrfachsynthesen sind damit praktisch ausgeschlossen.

10 Bekannte Verfahren der komplexen Schutzgruppenchemie unter Einsatz lichtaktivierbarer Schutzgruppen erfordern lange Belichtungszeiten, wenn eine hohe Schritteffizienz angestrebt wird, wodurch der Gesamtprozeß zur Herstellung einer Bibliothek sehr zeitaufwendig wird. Außerdem bedingt die Lichtempfindlichkeit letzt genannter Verfahren eine besonders aufwendige Prozeßdurchführung. In Proc. Natl. Acad. Sci. 15 USA, Vol. 93, Nov. 96, S. 13555-13560 ist ein derartiges Verfahren zur Erzeugung von Substanzbibliotheken beschrieben, bei dem ein Substrat zunächst mit einer geeigneten Schutzgruppe oder mit einem eine erste Schutzgruppe tragenden Monomer versehen wird. Danach wird eine Substratoberfläche mit einem photoaktivierbaren Lackresist beschichtet, 20 Teilbereiche entsprechend einem vorgegebenen Synthesealgorithmus belichtet und strukturiert. In den strukturierten Bereichen erfolgt die Abspaltung der Schutzgruppe, in den freigelegten Bereichen kann danach die Anbindung eines zweiten Monomers erfolgen. Nach Entfernung der übrigen Lachsschichten kann der gesamte Prozeß mit einer entsprechend 25 angepaßten, neu zu strukturierenden Lackschicht wiederholt werden. Der Hauptnachteil neben oben bereits genannten Nachteilen dieser Vorgehensweise besteht in der nicht vollständigen Entfernung von Fotolackresten von der Bibliotheksmatrix, wodurch die Ausbeute pro 30 Syntheseschritt und damit die Gesamtsyntheseausbeute sinkt.

- 3 -

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von strukturierten, selbstorganisierten molekularen Monolagen einzelner molekularer Spezies anzugeben, das reproduzierbare und mehrfache Wiederholungen der Bildung und lokal definierten Anbindung von molekularen Bausteinen an molekulare Monolagen mit einer hohen Ausbeute zuläßt. Das zu schaffende Verfahren soll insbesondere die Ausbildung von Testassays und festphasengebundenen Substanzbibliotheken ermöglichen.

5 Die Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale der Patentansprüche gelöst.

10 Gemäß der Erfindung gelangen speziell präparierte, mikrostrukturierte Polymermasken zum Einsatz, die für den Andruck an ein angepaßtes Substrat ausgelegt sind und welche in vorgegebenen Bereichen Öffnungen aufweisen, die die Erzeugung von monomolekularen Monolagen auf dem Substrat ermöglichen.

15 Die Erfindung soll nachstehend anhand schematischer Ausführungsbeispiele näher erläutert werden. Es zeigen:

20 Fig. 1a bis 1e eine Ausbildungsmöglichkeit für die Herstellung der erforderlichen Polymermasken,

Fig. 2 ein schematisches Ablaufschema zur Herstellung einer festphasengekoppelten Substanzbibliothek anhand eines speziellen Beispiels,

25 Fig. 3 ein Beispiel für eine nach der Erfindung in z-Richtung nanostrukturierte Oberfläche,

Fig. 4 andeutungsweise einen Teil eines Satzes unterschiedlichen Polymermasken zur Erzeugung von Substanzbibliotheken.

30 In den Figuren 1a bis 1d ist eine beispielhafte Ausbildungsmöglichkeit für die im Rahmen der Erfindung erforderlichen Polymermasken dargestellt. Ausgangspunkt ist dabei ein in Fig. 1a dargestellter 4"-Siliziumwafer 10, der beidseitig mit einer thermischen SiO<sub>2</sub>-Oxidschicht 11 einer Dicke von 500 nm beschichtet ist. Die SiO<sub>2</sub>-Oxidschichten 11 sind mit einer, mittels spin-coating aufgebrachter, in der Mikrostrukturierung üblicher

Photoresistschicht 12 abgedeckt. Eine dieser Photoresistschichten 12 wird mit einer nicht dargestellten Maske versehen, die so ausgeführt ist, daß im weiter zu beschreibenden Prozeßablauf ein an das später eingesetzte Substrat 2 in seinen Abmaßen angepaßter Rahmen 14 nach 5 erfolgter vollständiger Polymermaskenstrukturierung verbleibt. Die diesbezüglich verbleibenden Photoresistrestschichtbereiche 120 sind in Fig. 1b gezeigt, wodurch Fenster 121 freigelegt werden. In die erste  $\text{SiO}_2$ -Oxidschicht 11 werden entsprechend der Maskenvorgabe Fenster eingeätzt und die Photoresistschichten entfernt; das Ergebnis dieser 10 Schritte, mit verbleibenden  $\text{SiO}_2$ -Maskenbereichen 110, ist in Fig. 1c dargestellt. Weiterhin zeigt Fig. 1c eine neu aufgebrachte photostrukturierbare Polymerschicht 13, die im Beispiel aus PDMS (Polydimethylsiloxan) unter Zusatz eines Quervernetzers, wie z.B. eine in organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Xylol oder Chloroform, lösliche 15 Diazidoverbindung oder 2,2-Dimethoxy-2-phenyl-acetophenon, gefertigt ist. Es liegt im Rahmen der Erfindung, je nach späteren Einsatzfällen und verwendeten Agenzien für diese Polymerschicht 13 auch andere Materialien einzusetzen, bspw. Polyvinylalkohol, PMMA, Polyvinylpyrrolidon usw., die mit einem geeigneten Vernetzer versehen 20 wurden, wie z.B. einem Salz des Diazidostilbensulfats. Diese Polymerschicht 13 wird mit einer weiteren, nicht dargestellten Maske versehen, deren Struktur denen später auf ein noch zu beschreibendes Substrat 2 durch die zu erzeugenden Strukturen in der Polymerschicht 13 zu übertragenden Strukturen entspricht. Figur 1d zeigt das Ergebnis der 25 Struktererzeugung in der Polymerschicht 13 mit erzeugten Maskenfenstern 130. Zugleich ist in Fig. 1d dargestellt, wie die Siliziumbereiche, die nicht von den  $\text{SiO}_2$ -Maskenbereichen 110 abdeckt wurden, in einem weiteren Prozeßschritt unter Einsatz bekannter Ätzmittel entfernt wurden. Anschließend werden in einem weiteren 30 Ätzbad alle nicht abgedeckten  $\text{SiO}_2$ -Bereiche entfernt. Das Ergebnis eines einzelnen Siliziumrahmens, der von einer freitragenden, strukturierten Polymermaske 13 überspannt ist, ist in Fig. 1e dargestellt. Diese im weiteren als mikrostrukturierte Polymermaske 1 bezeichnete Baugruppe findet im Rahmen der Erfindung ein bis mehrfach Anwendung. Zur 35 Herstellung von Substanzbibliotheken werden weitere solcher Polymermasken 1 benötigt, die im weiteren alle mit 1 bezeichnet sind,

deren vorgegebene Öffnungenfenster 130 grundsätzlich zueinander deckungsgleich ausgeführt, jedoch teilweise, an einen Synthese- bzw. Modifikationsalgorithmus angepaßt, uneröffnet ausgeführt sind, wie es in Fig. 1f durch einen Pfeil 131 schematisch angedeutet ist. Die Art der Strukterzeugung in genannten Polymerfilmen 13 ist im Rahmen der Erfindung unerheblich; so können auch sogenannte Trockenätzverfahren zum Einsatz gelangen, wenn entsprechend kleine Öffnungen bis in den Submikrometerbereich erforderlich sind. Wesentlich ist lediglich, daß die erzeugte Polymermaske so dünn und flexibel gefertigt ist, daß sie auf ein im weiteren zu beschreibendes Substrat 2 aufgelegt, bereits durch Adhäsion haftet und sie gegen die im weiteren Prozeß zum Einsatz gelangenden Agenzien chemisch stabil ist. Ohne dies näher darzustellen, sind sämtlichen im Prozeß eingesetzter Polymermasken 1 und den zum Einsatz gelangenden Substraten 2 entsprechende Justiermarken gegeben, die eine exakte Ausrichtung z.B. mit Hilfe in der Mikrostrukturierung üblicher Maskaligner ermöglichen.

Im weiteren soll beispielhaft anhand von Fig. 2 die Präparation eines Substrates 2 im Sinne der Erfindung beschrieben werden. Als Substrat 2 soll ein mit Gold beschichteter Siliziumwafer Anwendung finden. Dieser soll frisch präpariert sein und kann in doppelt destilliertem Wasser gelagert werden. Auf das Substrat 2 wird eine nach vorherigem Beispiel hergestellte Polymermaske 1 aufgelegt und mit einer Reaktionslösung 3, mit der die im übrigen nicht näher dargestellte Goldoberfläche reagieren soll, überschwemmt. Im Beispiel wird für die Reaktionslösung 3 NHS-SS-Biotin gelöst zu 10 µg/ml in Phosphatpuffer, 0,01 M, pH 8,5 gewählt. Nach ca. 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Oberfläche mit reinem Puffer und destilliertem Wasser gewaschen und die Polymermaske 1 abgezogen. Daran anschließend wird über die gesamte Oberfläche des Substrats 2 Streptavidin gegeben, welches mit einer Affinität von ca.  $10^{-15}$  M an in den durch die Öffnungsbereiche 130 der Polymermaske 1 vorgegebenen Regionen immobilisierte Biotin bindet. Damit sind definierte Bereiche 20 auf der Goldoberfläche geschaffen, von denen in Fig. 3 nur drei mit Bezugslinien versehen sind, welche ausschließlich mit Streptavidin besetzt sind. Eine solcherart hergestellte monomolekulare Monolage, die in mehrere, regelmäßig verteilte Bereiche

20 unterteilt ist, lässt sich bspw. als Immobilisierungsmatrix für biotinylierte Moleküle verwenden, aber auch als Substrat mit räumlich selektiver Adhäsion oder definierter Grenzflächenenergie einsetzen.

5 In einem weiteren Ausführungsbeispiel soll die Präparation eines Substrats beschrieben werden, das als Ausgangssubstrat für die Ausbildung einer Substanzbibliothek dienen soll. Als Substrat 2 wird hier bspw. ein gereinigtes Siliziumplättchen eingesetzt, dessen gesamte Oberfläche im Beispiel zunächst durch eine Behandlung mit 3-Glycid-  
10 oxy-propyl-trimethoxsilan modifiziert werden soll. Das 3-Glycid-oxy-  
propyl-trimethoxysilan (10% in Toluol, 80°C, ca. 8 h), wird über das Substrat 2 geschwemmt. Eine zweistündige Inkubation des Substrates in 0,05 M HCl führt zur Hydrolyse des genannten Epoxids, es liegen damit freie Hydroxygruppen vor. Diese reagieren bspw. spontan mit  
15 Phosphoramiden. Dazu wird im Beispiel ein C18-Spacer-  
Phosphoramidit aktiviert mit Tetrazol in 0,1 M Lösung in Acetonitril mit der modifizierten Substratoberfläche für 10 min zur Reaktion gebracht.  
Danach wird die Oberfläche gründlich mit Acetonitril gewaschen. Die  
20 Oberfläche des Substrats ist jetzt mit Dimethoxytritylgruppen besetzt, die ihrerseits bekannte Standardschutzgruppen in der Phosphoramiditschutz-  
gruppenchemie sind.

Auf das so präparierte Substrat 2 wird, analog wie zu Fig. 2 beschrieben, eine bspw. nach Fig. 1 gefertigte Polymermaske 1 aufgelegt und mittels eines Maskaligners entsprechend positioniert. Nach erfolgter  
25 Positionierung kann das Sandwich, bestehend aus dem Substrat 2 und der Polymermaske 1 aus der Halterung entnommen werden, da die Polymermaske, aufgrund ihrer Ausführung, adhäsiv auf der Oberfläche des Substrats haftet. Über diesen Sandwichverbund wird 2% Triflouressigsäure in H<sub>2</sub>O gegeben, wobei in den  
30 Polymermaskenöffnungsbereichen 130 eine Abspaltung der nach obigem Beispiel erzeugter Schutzgruppen stattfindet. Danach wird die Polymermaske 1 vom Substrat abgezogen und es liegen analog zu Fig. 3 verteilte, von einer vordefiniert auswählbaren Schutzgruppe befreite Bereiche 20 vor. Bereits in diesem Zustand kann das Substrat als  
35 Testassay Verwendung finden. Die jeweils spezielle Art der

Substratpräparation ist mannigfaltig und an eine Vielzahl späterer Verwendungen anpaßbar.

Dieses so vorbereitete Substrat kann im weiteren bspw. einem an sich bekannten Phosphoramidzyklus unterworfen werden, um ein weiteres 5 Oligonukleotidmonomer an die bezeichneten Bereiche 20 anzusynthetisieren.

Zum Aufbau einer Substanzbibliothek werden im Rahmen der Erfindung weitere Polymermasken 1 vorgesehen, die entsprechend der zu synthetisierenden Stoffgruppe variabel anpaßbar derart ausgestaltet sind, 10 daß ihre Öffnungen 130 grundsätzlich mit den Öffnungen 130 der ersten Polymermaske deckungsgleich korrespondieren, jedoch teilweise uneröffnete Maskenbereiche 131 aufweisen, wie sie beispielhaft in Fig. 4 angedeutet sind. Ebenso liegt es im Rahmen der Erfindung, bei Bedarf größere Öffnungen auszubilden und damit größere benachbarte Bereiche 15 auf dem Substrat anzusprechen. Zur Verlängerung der molekularen Spezies an den vorgesehenen Orten wird eine dem Synthesezyklus entsprechende neue Polymermaske aufgelegt, die entsprechend zu synthetisierende Substanz aufgegeben, entsprechende Reaktions- und Reinigungsschritte durch geführt und anschließend die verwendete 20 Polymermaske wieder abgezogen. Trotz der dadurch bedingten unterschiedlichen Wachstumshöhe einzelner molekularer Spezies, bestehend aus jeweils mehreren Monomeren, in den verschiedenen 25 Synthesebereichen des Substrats bleibt die adhäsive Haftung der jeweiligen Polymermasken erhalten und es kommt selbst bei synthetisierten Schichtpaketen mit Kettenlängen von 30 - 100 oder mehr, nicht zu einer Unterspülung der jeweiligen Polymermasken durch die 30 nachfolgende Syntheselösung. Auf die beschrieben Weise sind, unter Zuhilfenahme apparativer Technik aus dem Bereich der Mikrostrukturierung, zuverlässig Substanzbibliotheken mit hoher Reproduzierbarkeit und Ausbeute aufbaubar.

Der Aufbau beliebiger Polymer- und Substanzbibliotheken, wie z.B. Peptid-, Polysacharid-, Polyterpen- usw. Bibliotheken ist mit Hilfe der Erfindung durchführbar. Es ist auch die Herstellung gemischter Bibliotheken, worunter das Aufbringen von molekularen Spezies 35 unterschiedlicher Substanzklassen auf einem Substrat verstanden werden soll, möglich. Ebenso besteht die Möglichkeit des Aufbaus von

Bibliotheken mit Mischpolymeren, worunter Polymere, bestehend aus Monomeren unterschiedlicher Substanzklassen, verstanden werden. Voraussetzung hierfür ist die Kompatibilität der Schutzgruppen bzw. der funktionellen Kopplungsgruppen. Die Herstellung von verzweigten 5 Polymeren bei Verwendung entsprechender mehrfach funktionalisierter, mehrfach geschützter Monomere ist ebenso möglich.

Die beschriebenen Probleme nach dem Stand der Technik hergestellter Substanzbibliotheken werden wirkungsvoll vermieden. Die in den verwendeten Polymermasken vorgesehenen Öffnungen sind bis in den 10 Submikrometerbereich herstellbar. Das Verfahren bietet den grundsätzlichen Vorteil, keinerlei Restriktion an die jeweils angewandte Chemie zu stellen. Die Materialien der verwendeten mechanischen Teile sind grundsätzlich dem Reaktionszyklus anpaßbar.

15 Alle in der Beschreibung, den nachfolgenden Ansprüchen und der Zeichnung dargestellten Merkmale können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination miteinander erfindungswesentlich sein.

Bezugszeichenliste

1	-	Polymermaske
10	-	Siliziumwafer
11	-	SiO <sub>2</sub> -Oxidschicht
110	-	SiO <sub>2</sub> -Maskenbereiche
12	-	Photoresistschicht
120	-	Photoresistrestschichtbereiche
121	-	Fenster
13	-	Polymerschicht
130	-	Öffnungsbereiche in der Polymerschicht 13
131	-	uneröffnete Maskenbereiche in der Polymerschicht 13
14	-	Rahmen
2	-	Substrat
20	-	definierte Bereiche auf dem Substrat 2

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von strukturierten, selbstorganisierten molekularen Monolagen einzelner molekularer Spezies, insbesondere von Substanzbibliotheken, dadurch gekennzeichnet, daß
  - 5 a) auf ein, dem vorgesehenen Verwendungszweck und einer herzustellenden ersten Monolage angepaßt ausgewähltem oder speziell präpariertem Substrat
  - 10 b) eine mikrostrukturierte Polymermaske, die definiert vorgegebene, jeweils gewünscht anzusprechenden Bereichen des Substrats entsprechende Öffnungen aufweist, wenigstens einmal auf das Substrat definiert ausgerichtet aufgelegt wird, wobei die Polymermaske so dünn und flexibel ausgeführt ist, daß sie bereits durch Adhäsion auf dem Substrat haftet und
  - 15 die Auswahl des für die Polymermaske eingesetzten Materials nach Maßgabe weiterer im jeweiligen Prozeßschritt zum Einsatz gelangender Agenzien derart erfolgt, daß das Polymermaskenmaterial gegen diese chemisch stabil ist,
  - 20 c) das Sandwich, bestehend aus Substrat und Polymermaske, mit einem dem Anwendungszweck entsprechenden ersten Agens, zur Bildung wenigstens einer ersten molekularen Monolage in den Maskenöffnungsbereichen, überschwemmt wird,
  - 25 c1) der Schritt nach c) je nach auszubildender Monolagenstruktur mit dem ersten Agens oder ein oder mehreren weiteren Agenzien wiederholt wird und
  - d) nach Ausführung des Schritts nach c) oder der Schritte nach c) und c1) die Polymermaske nach erfolgter, den Maskenöffnungsbereichen entsprechenden Modifikation der, dem Agens oder den Agenzien ausgesetzten Substratoberflächenbereiche abgezogen wird.

- 11 -

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Schritte nach b) bis d) jeweils unter Verwendung weiterer Polymermasken und weiterer Agenzien derart mehrfach wiederholt werden, daß die weiteren Polymermasken eine deckungsgleich justierte Ausrichtung zur Ausrichtung der ersten Polymermaske erfahren, die in den weiteren Polymermasken vorgesehenen Öffnungen grundsätzlich mit den Öffnungen der ersten Polymermaske deckungsgleich korrespondierend festgelegt sind, jedoch teilweise, dem jeweiligen Synthese- oder Modifikationsalgorithmus angepaßt, uneröffnet ausgeführt werden.  
10
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß Polymermasken eingesetzt werden, die aus einem Rahmen gebildet sind, dessen äußere Abmaße im wesentlichen den äußeren Abmessungen des Substrats, auf das sie aufgelegt werden, entsprechen  
15 und der Rahmen substratseitig von einer Polymerfolie überspannt ist, in die genannte Öffnungen eingebracht sind.

1 / 2

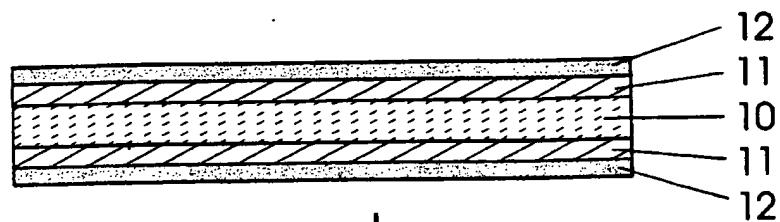


Fig. 1a

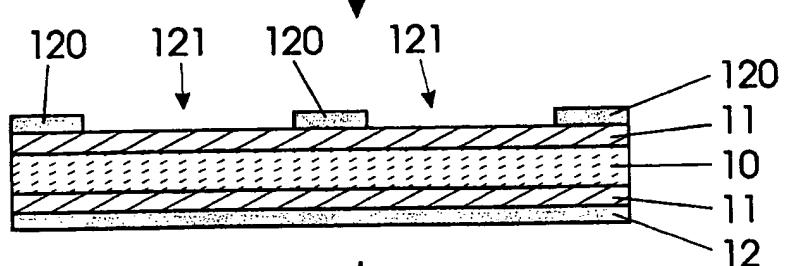


Fig. 1b

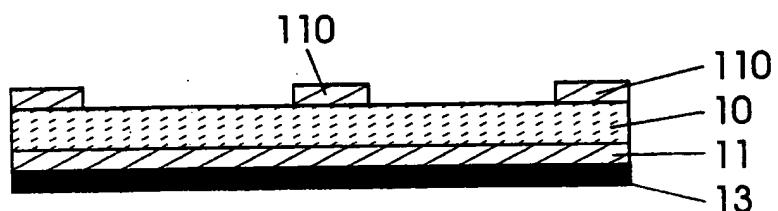


Fig. 1c

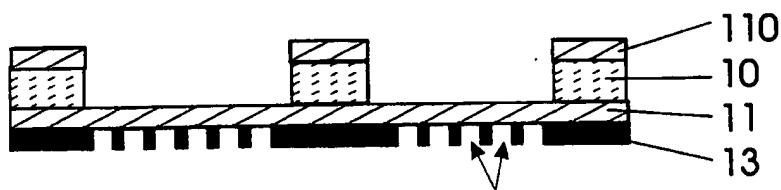


Fig. 1d

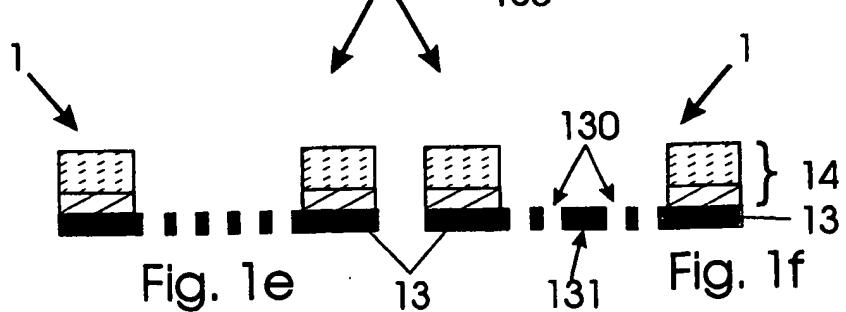


Fig. 1e

Fig. 1f

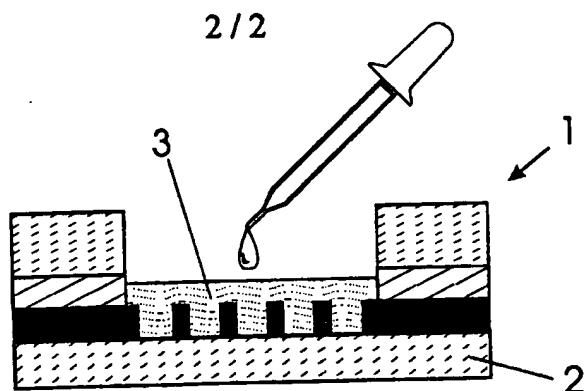


Fig. 2

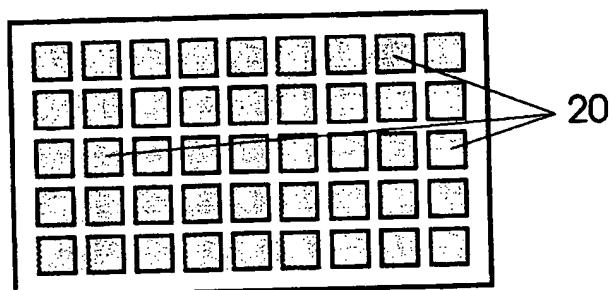


Fig. 3

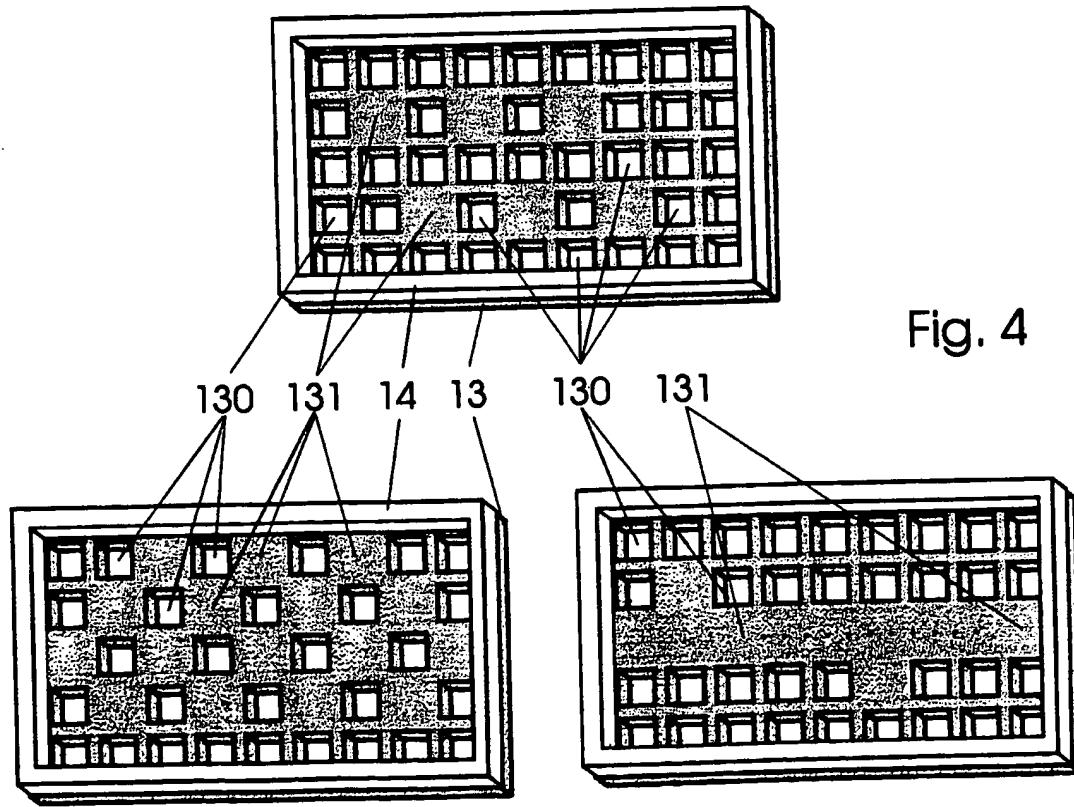


Fig. 4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No  
CT/EP 98/00676

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 B01J19/00 C07B61/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
**IPC 6 B01J C07B**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 599 695 A (R.F.PEASE ET AL.) 4 February 1997 see abstract see column 1, line 50 - line 63 see column 2, line 20 - line 27 see column 3, line 9 - line 36 see column 12, line 50 - line 67 see column 13, line 36 - line 44 see column 14, line 48 - column 16, line 9 see figures 6,7,14,15,22 --- 	1-3
A	US 5 429 807 A (ROBERT S. MATSON ET AL.) 4 July 1995 cited in the application see the whole document --- 	1-3
A	US 5 258 091 A (TAKAHIRO IMAI & NAOJI FUJIMORI) 2 November 1993 --- 	-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

involve an inventive step when the document is taken alone  
\*\* document of particular relevance; the claimed invention  
cannot be considered to involve an inventive step when the  
document is combined with one or more other such docu-  
ments, such combination being obvious to a person skilled

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 July 1998	16/07/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Stevnsborg, N

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 98/00676	
---	--

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 97 33737 A (PRESIDENT AND ELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 18 September 1997 see abstract see page 35, line 29 - page 40, line 13 see figures ---	1-3
P,A	WO 97 06468 A (ELY RABANI) 20 February 1997 see page 27, line 11 - page 32, line 15 ---	1-3
A	US 5 489 678 A (STEPHEN P.A. FODOR ET AL.) 6 February 1996 cited in the application -----	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

national Application No

PCT/EP 98/00676

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 5599695	A	04-02-1997	EP	0728520 A		28-08-1996
US 5429807	A	04-07-1995	EP	0675760 A		11-10-1995
			JP	8505407 T		11-06-1996
			WO	9511748 A		04-05-1995
US 5258091	A	02-11-1993	JP	4127100 A		28-04-1992
			DE	69114638 D		21-12-1995
			DE	69114638 T		25-07-1996
			EP	0476827 A		25-03-1992
			US	5173612 A		22-12-1992
WO 9733737	A	18-09-1997	AU	2324797 A		01-10-1997
WO 9706468	A	20-02-1997	AU	6752496 A		05-03-1997
US 5489678	A	06-02-1996	US	5143854 A		01-09-1992
			US	5753788 A		19-05-1998
			US	5744305 A		28-04-1998
			AU	663300 B		05-10-1995
			AU	9153491 A		08-07-1992
			CA	2097708 A		07-06-1992
			EP	0562025 A		29-09-1993
			JP	6504997 T		09-06-1994
			MX	9102400 A		01-06-1992
			NZ	240744 A		27-04-1994
			WO	9210092 A		25-06-1992
			US	5744101 A		28-04-1998
			US	5424186 A		13-06-1995
			ZA	9109650 A		07-06-1993
			AT	110738 T		15-09-1994
			AU	651795 B		04-08-1994
			AU	5837190 A		07-01-1991
			AU	672723 B		10-10-1996
			AU	7765594 A		04-05-1995
			CA	2054706 A		08-12-1990
			DE	69012119 D		06-10-1994
			DE	69012119 T		22-12-1994
			DK	476014 T		14-11-1994
			EP	0476014 A		25-03-1992

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/EP 98/00676

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5489678	A	EP 0619321 A	12-10-1994
		ES 2058921 T	01-11-1994
		GB 2248840 A, B	22-04-1992
		HK 61395 A	05-05-1995
		HK 64195 A	05-05-1995
		IL 94551 A	30-03-1995
		JP 4505763 T	08-10-1992
		KR 9701577 B	11-02-1997
		KR 9701578 B	11-02-1997
		WO 9015070 A	13-12-1990
		NL 191992 B	01-08-1996
		NL 9022056 T	02-03-1992
		NO 301233 B	29-09-1997
		SG 13595 G	16-06-1995
		US 5547839 A	20-08-1996
		US 5405783 A	11-04-1995
		US 5510270 A	23-04-1996
		US 5445934 A	29-08-1995
		US 5527681 A	18-06-1996

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00676

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 B01J19/00 C07B61/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 B01J C07B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>2</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 599 695 A (R.F.PEASE ET AL.) 4.Februar 1997 siehe Zusammenfassung siehe Spalte 1, Zeile 50 - Zeile 63 siehe Spalte 2, Zeile 20 - Zeile 27 siehe Spalte 3, Zeile 9 - Zeile 36 siehe Spalte 12, Zeile 50 - Zeile 67 siehe Spalte 13, Zeile 36 - Zeile 44 siehe Spalte 14, Zeile 48 - Spalte 16, Zeile 9 siehe Abbildungen 6,7,14,15,22 ---	1-3
A	US 5 429 807 A (ROBERT S. MATSON ET AL.) 4.Juli 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-3 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
6.Juli 1998	16/07/1998
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Stevnsborg, N

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00676

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 258 091 A (TAKAHIRO IMAI & NAOJI FUJIMORI) 2.November 1993 ---	
P,X	WO 97 33737 A (PRESIDENT AND ELLIOTS OF HARVARD COLLEGE) 18.September 1997 siehe Zusammenfassung siehe Seite 35, Zeile 29 - Seite 40, Zeile 13 siehe Abbildungen ---	1-3
P,A	WO 97 06468 A (ELY RABANI) 20.Februar 1997 siehe Seite 27, Zeile 11 - Seite 32, Zeile 15 ---	1-3
A	US 5 489 678 A (STEPHEN P.A. FODOR ET AL.) 6.Februar 1996 in der Anmeldung erwähnt -----	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00676

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5599695	A	04-02-1997	EP	0728520	A	28-08-1996
US 5429807	A	04-07-1995	EP	0675760	A	11-10-1995
			JP	8505407	T	11-06-1996
			WO	9511748	A	04-05-1995
US 5258091	A	02-11-1993	JP	4127100	A	28-04-1992
			DE	69114638	D	21-12-1995
			DE	69114638	T	25-07-1996
			EP	0476827	A	25-03-1992
			US	5173612	A	22-12-1992
WO 9733737	A	18-09-1997	AU	2324797	A	01-10-1997
WO 9706468	A	20-02-1997	AU	6752496	A	05-03-1997
US 5489678	A	06-02-1996	US	5143854	A	01-09-1992
			US	5753788	A	19-05-1998
			US	5744305	A	28-04-1998
			AU	663300	B	05-10-1995
			AU	9153491	A	08-07-1992
			CA	2097708	A	07-06-1992
			EP	0562025	A	29-09-1993
			JP	6504997	T	09-06-1994
			MX	9102400	A	01-06-1992
			NZ	240744	A	27-04-1994
			WO	9210092	A	25-06-1992
			US	5744101	A	28-04-1998
			US	5424186	A	13-06-1995
			ZA	9109650	A	07-06-1993
			AT	110738	T	15-09-1994
			AU	651795	B	04-08-1994
			AU	5837190	A	07-01-1991
			AU	672723	B	10-10-1996
			AU	7765594	A	04-05-1995
			CA	2054706	A	08-12-1990
			DE	69012119	D	06-10-1994
			DE	69012119	T	22-12-1994
			DK	476014	T	14-11-1994
			EP	0476014	A	25-03-1992

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00676

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5489678 A			
		EP 0619321 A	12-10-1994
		ES 2058921 T	01-11-1994
		GB 2248840 A, B	22-04-1992
		HK 61395 A	05-05-1995
		HK 64195 A	05-05-1995
		IL 94551 A	30-03-1995
		JP 4505763 T	08-10-1992
		KR 9701577 B	11-02-1997
		KR 9701578 B	11-02-1997
		WO 9015070 A	13-12-1990
		NL 191992 B	01-08-1996
		NL 9022056 T	02-03-1992
		NO 301233 B	29-09-1997
		SG 13595 G	16-06-1995
		US 5547839 A	20-08-1996
		US 5405783 A	11-04-1995
		US 5510270 A	23-04-1996
		US 5445934 A	29-08-1995
		US 5527681 A	18-06-1996